

新しい3元系マグネシウム合金の生体内挙動制御と 表面処理効果に関する3次元的评价

著者	村木 健二
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第19140号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00129241

新しい3元系マグネシウム合金の生体内挙動制御と
表面処理効果に関する3次元的评价

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻
外科病態学講座 形成外科学分野
村木 健二

目次

頁

1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8	要旨	• • • • • 3
9		
10	研究背景	• • • • • 8
11		
12	研究目的	• • • • • 15
13		
14	研究方法	• • • • • 17
15		
16	研究結果	• • • • • 24
17		
18	考察	• • • • • 32
19		
20	結論	• • • • • 39
21		
22	謝辞	• • • • • 40
23		
24	文献	• • • • • 42
25		
26	図	• • • • • 48
27		
28	表	• • • • • 69
29		

I 要旨

【背景・研究目的】

現在、骨固定材料として、主にチタン合金が用いられている。それは、機械的強度や生体親和性が優れているためであり、特に顎顔面領域での薄いプレートやスクリューとして頻用されている。一方で、近年チタンプレートの小児への使用に伴う成長障害などの有害事象も報告されるようになり、吸収性骨固定材料へのニーズが高まっている。そこで、吸収性骨固定材料に骨接合部の治癒を促進または補助する能動的な効果があれば、より理想的な骨固定材料に成りうる可能性があると考えられた。最近、マグネシウムには骨再生効果を期待できるとの報告がなされ、マグネシウム合金に注目が集まっている。そのため私は、マグネシウム合金の機械的強度を調べ、生体内挙動を制御することを目的として研究を行った。これまでの、マグネシウム合金とは異なり、三元系（Mg-Ca-Zn）合金を用いて行った。その表層に表面処理を施す事で、ガス発生や生体内挙動は変化するのかを確認することを目的とした。表面処理は、水酸化マグネシウム（耐蝕層）を析出させる表面処理と、耐蝕層上にリン酸カルシ

1 ウム系（化合物ブルシャイト）を析出させる表面処理を準備し、表面処理を施
2 さなかった合金、コントロールとしてチタン合金も含めて比較評価を行った。
3 このマグネシウム合金への表面処理の存在による生体内挙動の変化を確認する
4 事を目的に研究を行った。

5 【方法】

6 評価方法として、マイクロ computed tomography (CT)撮影、非脱灰研磨標本
7 による組織学的観察ならびにエネルギー分散型X線分析 (EDX: Energy
8 dispersive X-ray spectrometry)にて元素分析を行った。また、CT 撮影データ
9 を基に、そのデータから3次元構築し、チタン合金とマグネシウム合金（裸
10 材、耐蝕層、耐蝕層＋ブルシャイト）の3群を、発生したガスによる空胞体積
11 の変化、合金の体積変化、新生骨の体積変化を経時的、表面処理別に計測し検
12 討した。

13 【結果】

14 マイクロX線CT撮影により、マグネシウム合金周囲にガス像、ならびに新
15 生骨の形成も認めた。CTデータを用いて、3次元構築した結果、CT像の平面
16 でみえていた空胞・ガス像や新生骨が連続した一塊のものであることがわかっ

1 た。また、非脱灰研磨標本による組織所見においてマグネシウム合金では、1
2 週では、表層に腐蝕生成物を認めた。4週では、腐蝕生成物を介して新生骨が
3 接しており、周囲に空胞形成を認めた。チタンでは、1、4週ともに線維性組
4 織を認めたが、新生骨や空胞は認めなかった。CTデータを用いて、3次元構築
5 した結果、病理組織やCT像の平面でみえていた空胞・ガス像や新生骨が連続
6 した一塊のものであることがわかった。3次元構築したデータを用いて、ガス
7 体積の経時的変化、新生骨体積量の経時的変化、ネイル体積の経時的変化を検
8 討した。その結果として、ガス体積は4週において、チタン合金群と耐蝕層で
9 ($p=0.0083$)、耐蝕層群とブルシャイト群の間に有意差を認めた($p=0.0358$)。新
10 生骨体積量は、4週において、チタン合金群と耐蝕層群($p=0.0023$)および、
11 耐蝕層群とブルシャイト群($p=0.0149$)、チタン合金群と裸材群($p=0.0373$)間
12 においてそれぞれ有意差を認めた。ネイル体積は、4週において耐蝕層群が裸
13 材群($p=0.0403$)、ブルシャイト群($p=0.0976$)となり、裸材群とのみ有意差を認
14 めた。

15 **【考察】**

1 本研究において、表面処理を行う事で、生体内での反応を目的に応じて調整
2 する事ができるのではないかという事が示唆された。それは、ガス体積につい
3 ては、裸材群では早期に強い反応が起こり、速やかに鎮静化していく。一方
4 で、表面処理群（耐蝕層群、ブルシャット群）では裸材群に比較し反応のピーク
5 は緩やかに起きている可能性がある。また、骨形成については、マグネシウム
6 合金周囲との反応強度とその持続期間に影響されるのではないかと考えた。こ
7 れは、4週においてブルシャット群は、チタン群と有意差を認めないため、生
8 体内反応が安定していると言える一方で、耐蝕層群と裸材群はチタンと有意差
9 を認め、周囲との反応が強く持続していると言える。ブルシャット群と裸材群に
10 有意差は認めないが、計測値よりこの反応の傾向が出ていると思われた。つい
11 でネイル体積については、いずれのマグネシウム合金においても周囲と反応し
12 た事による体積の減少を認めた。特に耐蝕層において顕著であり、ガス体積や
13 骨形成のどちらも多く、反応が強く持続している可能性から想定される結果と
14 一致するものと思われた。これらのことより表面処理を行う事で、生体内骨固
15 定材料として、安定した挙動を目指すために反応強度を調節したり、骨形成を
16 もたらすために腐蝕反応を長時間持続させたりすることが意図的に行える可能

- 1 性が示唆される。今回の結果は、今後のマグネシウム合金に対する表面処理の
- 2 選択において、一つの指標とすることができるのではないかと考える。
- 3 **【結論】**
- 4 本研究において、表面処理の種類によってマグネシウム合金の生体内挙動が
- 5 変化する事が明らかになった。これにより表面処理がマグネシウム合金の生体
- 6 内挙動を制御・調整できる可能性が示された。
- 7 私の研究は、生体吸収性と十分な強度に加えて骨形成能を持つ新たなマグネ
- 8 シウム合金による骨固定材料開発への表面処理の意義と可能性を示したものと
- 9 考える。
- 10

II 研究背景

19 世紀までの骨折に対する加療方法は、添え木やギブスによる外固定が主流であったが、良好な骨治癒を得ることは時に困難であり、長期間を要するものであった。より良好な骨治癒を短期間で得られるように、金属による内固定が 1917 年 Johannes によって初めて行われた。その後、金属プレートとスクリューによる内固定という概念は、Hans Luhr により 1967 年に報告された Vitallium®（コバルト-クロム-モリブデン合金）を用いたプレートとスクリューによる内骨固定にて一般化した⁽¹⁾。このような、骨接合の歴史の中で、骨固定材料としてより薄く強度のある素材、生体親和性に優れている素材が求められてきた。

現在、骨固定材料として最も用いられているチタンの発見は 1791 年と早かったものの、その臨床への利用は遅く、1952 年に Branemark によってチタンと骨が光学顕微鏡レベルで一体化した状態の【Osseointegration】となることが発見され⁽²⁾、チタンと骨組織が拒否反応を起こさず結合する事が明らかになるまで待たねばならなかった。その後、チタン素材のプレートは 1965 年に臨床応

1 用されて以降、現在まで様々な医療用骨接合材として汎用されている^(3, 4)。一
2 方でマグネシウムは、1808 年に Sir Humphrey Davy によって発見されたと言わ
3 れており⁽⁵⁾、その臨床応用はチタンより早く、1878 年に最初の臨床報告が Huse
4 EC によってなされている⁽⁶⁾。それは、マグネシウムワイヤーによる出血血管の
5 結紮手技の報告であり、止血及び経過良好と報告されている。これを機にマグ
6 ネシウム合金による生体内材料の開発・研究が行われる事となったが、純マグ
7 ネシウム合金による材料では、強度が不足し捻れに弱く脆い構造であり⁽⁷⁾、臨
8 床に用いるには不十分であった。また、*in vivo* と *in vitro* でのマグネシウム合
9 金の腐蝕反応は異なり、埋植する場所でも反応が異なるため⁽⁸⁾反応を制御する
10 事が難しく、反応によって生じる腐蝕生成物やガスによって合金周囲に悪影響
11 を及ぼす可能性も指摘された⁽⁹⁾。つまり、マグネシウム合金が接している部分
12 の骨融解や、反応に伴う炎症が惹起されるといった骨治癒に不適切な反応が問
13 題となった。このような経緯から、工業用合金としては用いられたが、医療用
14 素材としてはなかなか普及することはなかった。それに代わり先に述べたチタ
15 ンやステンレス鋼の生体安定性や強度が開発、生成されることになりマグネシ
16 ウム合金への関心は低くなった。その一方で、チタンプレートの小児への使用

に伴う成長障害などの有害事象も報告されるようになり⁽¹⁰⁾、吸収性素材への期待は依然としてあった。マグネシウム合金においては強度、延性の問題に対して、アルミニウムを混合する二元系素材や、その他（カドミウム、亜鉛、ビスマス、アンチモン、銀、金、プラチナ）及び三元系（Mg-Pb-Bi、Mg-Cu-Au）などを提唱したが、いずれも脆く実用には至らなかった⁽⁷⁾。

そこで、吸収性素材として新たに、生体内物質である乳酸に注目し開発・研究が行われた。1962年にポリグリコール酸（polyglycolic acid：PGA）による吸収性合成繊維縫合糸が開発され、1970年から臨床応用された。また、PGAにポリ乳酸（polylactic acid：PLA）の共重合体も開発され、使用されている。これらの開発とともに生体内吸収性の骨接合システムとして1966年以降研究が行われ、1994年にポリ-L-乳酸（poly-L-lactic acid:PLLA）製の吸収性骨接合材が臨床応用された。PLLAは構成成分である乳酸が生体内代謝物質であり、体内において安全性・安定性がある事が長所であったが、当初より強度に関して欠点があった。加えて、吸収性ポリマーは強度を確保するためプレート自体の厚みがあり、眼窩部などの皮下脂肪の少ない場所や、痩せている人への使用では体表面から触知される可能性があり、整容面への懸念も欠点に挙げら

1 れており、現在でも十分に普及しているとは言いがたい状況である。

2 これらの経緯から、骨折部骨固定材料として吸収性素材への期待とニーズは

3 高いが、素材としての強度に課題がある事が明らかである。さらに、吸収性の

4 骨固定材料に骨接合部の治癒を促進または補助する能動的な効果があれば、よ

5 り理想的な骨固定材料に成りうる可能性があると考えた。

6 最近、マグネシウムには骨再生効果を期待できるとの報告がなされて⁽¹¹⁻¹⁶⁾、

7 再びマグネシウム合金に注目が集まっている。1900 年当時はマグネシウムの精

8 製精度が不十分で生体内反応も安定せず、臨床応用に至らなかったが、近年の

9 精製技術の向上に伴い改めて高強度材料としての開発が可能となった⁽¹⁷⁾。

10 Heublein らのグループによって 1998 年頃より生分解性金属ステントが開発さ

11 れて以降⁽¹⁸⁾、血管ステントへの応用^(19,20)、生体用クリップ^(21,22)などの開発が行

12 われている。一方、機械的な強度が重要視される骨折部の固定材料としても、

13 骨再生効果を期待できる骨折部固定用のプレートおよびスクリューとして開発

14 も盛んに行われている⁽²³⁾。一般的な組成のマグネシウム合金では、Zn や Ca 以

15 外の元素も含み、分解に際して細胞毒性を生じる可能性がある⁽²⁴⁾。しかし、本

16 研究においては、神戸大学工学部の向井らが生成に成功した医療用に特化した

1 均一結晶化した **Mg-Ca-Zn** の三元系合金製ネイルは安全に臨床応用できるもの
2 である。また、通常の純マグネシウム鋼材あるいは市販の工業用マグネシウム
3 合金では骨固定に際して十分な強度が獲得できていないものが多いが、私が本
4 研究で用いているマグネシウム合金は強度においても純チタンより優れ、生体
5 吸収性樹脂である **PLLA** を遥かに凌ぐ性能を有している^(25,26)。これらの利点か
6 ら、向井らの開発したマグネシウム合金を用いる事で本研究を臨床応用に即し
7 た形で行なう事を可能とした。

8 しかし、そのマグネシウム合金における生体内挙動を制御する方法は未だ確
9 立していない。また、生体内挙動によって生じる生体側の反応も、これまで病
10 理組織学的評価に加えて X 線写真などの二次元での評価が主であり、反応によ
11 って生じるガスなどの立体構造を一部の平面でしか捉えることができておらず
12 十分な評価はできていなかった。マグネシウム合金の反応は初期に急激な融解
13 反応が起こる。それは表面全体で腐蝕反応が起こるためである。反応によって
14 発生する腐蝕生成物である水酸化マグネシウムが合金周囲を覆うため反応は緩
15 徐となっていく事が分かっている⁽²³⁾。また、マグネシウム合金の反応のピーク
16 は溶出量の観点からはマグネシウム合金の組成に寄らず、埋植後直後より 24

1 時間迄に起きている事が、Satou らの研究で示された⁽²⁷⁾。これらの事から、生
2 体材料としてのマグネシウム合金の開発にあたり、初期の生体内反応の挙動に
3 重点を置いて制御できれば良いのではないかと考えた。これまで、マグネシウ
4 ム合金への表面処理はハイドロキシアパタイトやブルシャイト、モネタイトが
5 検討されており⁽²⁸⁾、表面処理をすることで未処理群よりも反応が抑えられてい
6 ると報告されている。その中で、反応の抑制とは経時的な金属の溶解量で評価
7 しており⁽²⁸⁾、*in vivo* と *in vitro* での違いについては、生体内ではリン酸カルシ
8 ウムや炭酸水素イオンなどによる緩衝機能があるため反応が抑制されると報告
9 されている⁽²⁹⁾。そのため、最近のマグネシウム合金に対する研究は、安定した
10 生体内分解挙動を保てるように、様々な金属組成および表面処理を用いた研究
11 がなされ報告されている^(24,25)。

12 このような背景のもと、私は、合金に耐蝕性のある表面処理を行う事で、生体
13 内での合金の挙動を制御・調整できないかと考えた。そしてその制御はマグネ
14 シウムのもつ骨新生能へ影響があるのではないかと考えている。生体内骨固定
15 材料として吸収性素材のマグネシウム合金に求められている事は、骨癒合が完
16 了するまでの期間生体内で強度・形態を保つ事である。しかし、吸収反応を完

1 全に抑制してしまうと生体吸収性という利点が失われてしまうとともに、吸収
2 反応過程が関与していると思われる新生骨の形成という新たな能動的骨固定材
3 料としての魅力も失われてしまう。今回の研究では、表面処理を行っていない
4 マグネシウム合金の裸材（裸材）と水酸化マグネシウム（耐蝕層）を表面処理
5 した合金、耐蝕層上にブルシャイトにて表面処理した合金（ブルシャイト）、
6 加えてコントロールとしてのチタン合金を用いる事とした。これは、上述した
7 通りマグネシウム合金は初期に急激な反応が起こり、腐蝕生成物である水酸化
8 マグネシウムが合金周囲を覆うため反応は緩徐となっていく事が分かってい
9 る。そこで、予めマグネシウム合金に耐蝕層として表面処理を行う事でこの早
10 期反応を制御できないかと考え耐蝕層を選択した。これにより、反応によって
11 生じるガスを抑制する一方で骨形成に関しては促進させる事を期待した。ま
12 た、骨伝導性を有するブルシャイト⁽³⁰⁾は、耐蝕層に表面処理を行う事で、より
13 ガス発生を抑制させる効果があるのではないかと考えた。コントロールであるチ
14 タン合金、裸材、耐蝕層と比較して骨形成をより促進するのではないかと考え
15 検討した。
16

III 研究目的

本研究の目的は、耐蝕層とブルシャイトによる表面処理がマグネシウム合金の生体内での分解挙動にどのような影響を及ぼすのか、多角的に評価することである。

仮説として、耐蝕層を用いる事で早期反応を抑制する事ができると考えた。これは、裸材での反応によって生じる腐蝕生成物である水酸化マグネシウムを表面処理しているため、急激な反応を抑制する事になると考えていたからである。また、耐蝕層及びブルシャイト群では、ブルシャイトにおいてより顕著に抑制されるのではないかと考えた。これは、耐蝕層をさらに表面処理する事で、マグネシウム合金や耐蝕層が周囲組織と反応する表面積が減少する事によるものと考えた。加えて、骨形成に関してブルシャイトの骨伝導性⁽³⁰⁾が作用し、ブルシャイト>裸材>耐蝕層の順に新生骨が形成されるのではないかと想定した。裸材と耐蝕層においては、裸材が早期に反応するため、その反応に総じて骨形成も促されると考えたためである。

これらの仮説を検証するために、病理組織標本で合金周囲に生じている生体反

- 1 応の表面処理での違いを明らかにすること。エネルギー分散型X線分析で合金
- 2 と生体との接触面での変化を捉えること。特に合金の吸収過程で生じる腐蝕生
- 3 成物の分析と周囲生体組織との関係を明らかにすること。そして、本研究では
- 4 従来の二次元での評価だけではなく、三次元評価を加えることで埋植後の反応
- 5 を立体的に検討することとした。
- 6 三次元構築を加える事で、初めて以下の項目が明らかになると考えている。
- 7 ・ マグネシウム合金間におけるガス発生体積の違いや局在について。
- 8 ・ マグネシウム合金間における骨形成の局在と体積変化の違いについて。
- 9 ・ マグネシウム合金間におけるネイル試験片（以下、ネイルと記載する）体
- 10 積の変化について。
- 11

IV 研究方法

(1) 移植材料

実験群に用いる移植材料として、向井らが作製した Mg-Ca-Zn の 3 元系マグネシウム合金（特願 2004-194912、国際特許 PCT/JP2005/012279）を用いた。はじめに、重力鋳造により作製した合金インゴットについて、773 K にて溶体化処理を施した。その後、2 段階の押出加工を経て、直径 4 mm の押出丸棒素材を作製した。成分分析を行った結果から、合金の化学成分は、Mg-0.09 at.%Ca-2.0 at.% Zn-0.004 at.% Fe-0.003 at.%Si であることを確認した。押出素材の内部を光学顕微鏡を用いて観察した組織を図. 1A に示す。光学顕微鏡を用いているため、全ての結晶粒界を判別することはできないが、平均粒径：1 μ m 以下の再結晶粒により形成されていることが確認された。

次に押出丸棒素材から旋盤加工により、ネイルを作製した。また、コントロール群として同形状のチタン合金製ネイルを使用した。ネイルの形状は、ヘッド部分は ϕ 2 mm、軸は ϕ 1 mm、長さ 4 mm (内、ヘッドの高さ 1 mm) とした (図. 1B, C)。

1 本マグネシウム合金の強度を、神戸大学の向井らに依頼して計測した。通
2 常、ネイルはハンマーにより打撃されて骨へ貫入することから、素材の強度特
3 性を圧縮試験により評価することとした。そこで、得られた押出丸棒から、圧
4 縮試験片を作製した。ここでは、試験片形状を直径：3 mm, 高さ：6 mm とし
5 た。圧縮試験は試験温度：室温にて、ひずみ速度： $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の準静的速度にて
6 実施した。試験の結果得られた公称応力—公称ひずみ関係を図.1D に示す。試
7 験素材は降伏強度：352 MPa, 最大(破断)強度：591 MPa, 破断ひずみ：0.123 で
8 あることを確認した（図.1D）。生体材料として多用されている、純チタン
9 (Grade II)ならびに生体内分解性材料として市販されている PLLA の降伏強度
10 は、それぞれ 275 MPa 程度および 55 MPa 程度であることから、本研究に用い
11 たネイル用素材は、純チタン(Grade II)より 28 %高い強度を、PLLA と比較して
12 約 6 倍の高強度を有していることがわかった。

13

14 (2) 表面処理

15 マグネシウム合金の表面処理としては、水酸化ナトリウム水溶液に浸漬させ
16 ることにより基材表面に耐蝕層として水酸化マグネシウム層を形成させたも

1 の、さらに耐蝕層を形成させた後の基材を pH 3.5 に調整したリン酸カルシウ
2 ム水溶液に浸漬させることにより、耐蝕層の上にブルシャイトを析出させたも
3 のをそれぞれ作製した。また、コントロール群として表面処理なし（未処理）
4 のものも同時に評価した。なお、水酸化マグネシウムおよびブルシャイト析出
5 処理については日本パーカライジング㈱にて実施を頂いた。以下、マグネシウ
6 ム合金群で未処理の群を裸群、水酸化マグネシウム析出群を耐蝕層群、水酸化
7 マグネシウム析出層にブルシャイトを追加処理した群をブルシャイト群と呼ぶ
8 事とする。

9 表面処理として（図. 2）に示すように耐蝕層及びブルシャイトともに均一に
10 表面処理されている事がわかる。実際にマグネシウム合金表面を X 線回析法で
11 評価したものが図. 3、4 となる。水酸化マグネシウム及びブルシャイトが、各
12 群において表面処理されている事が示された。

13

14 （３）動物への埋殖

15 動物実験のすべてのプロトコルは、東北大学の動物管理使用委員会（仙台、
16 日本）によってレビューおよび承認され、「動物の愛護及び管理に関する法

律」に則りおこなわれた。

本研究には合計 12 羽のアウトブレッド日本白色ウサギ(JW/CSK)が用いられた。全身麻酔は 5.0%イソフルラン (Intervet, Tokyo, Japan) の吸入にて導入し、埋殖中は 2.0%に維持し、実験部である大腿骨近傍に経皮的に 1%エピネフリンを含むリドカインの皮下注射 (Astra Zeneca, Cambridge, UK) を行った。大腿部後面に皮膚切開を置き、大腿骨を露出し骨膜を剥離した後、ドリルを用い、骨孔を開けネイルを留置した。閉創の際は、骨膜を可及的に縫合し、その後皮膚縫合を行った。手術後 1 週、4 週でペントバルビタールを用いて安楽死させ、大腿部を検体として摘出した。不要な組織は可及的に除去したが、その際、埋殖金属が露出しないように留意した (図. 5)。1 週の期間選択として、極早期の反応を評価する目的で設定した。これは、マグネシウム合金の反応のピークが 24 時間迄に起きており⁽²⁷⁾、その初期の反応を骨形成と共に評価するためである。4 週の期間選択として、骨形成が評価できる点と臨床応用に際し、固定期間の目安である 4 週は合金形態を保ち骨固定材料として役割を担えるかを評価するためである。

チタン合金、裸材群、耐蝕層群、ブルシャイト群の計 4 群の 1, 4 週でそれぞれ

れ n=3 で上記操作を行った。但し、1 羽の白色ウサギに対して両側の大腿骨を
使用し、左右で別の群のネイルを埋植したため、本研究に用いられた白色ウサ
ギは合計 12 羽となった。

(4) マイクロ X 線 computed tomography (CT) 撮影

摘出されたサンプルは直ちにマイクロ X 線 C T (Comscan, Japan) で撮影さ
れた。撮影条件は、80 k V、80 uA、拡大率 30.7 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ で撮影した。断面に
てマグネシウム合金およびチタン製ネイル、既存骨、新生骨、空孔の状態を観
察した。

(5) 画像解析ソフトによる 3D 評価 (図. 3)

マイクロ X 線 CT にて撮影されたデータは DICOM 化し画像解析 Mimics®
(Materialise, Leuven, Belgium)にて 3 次元構築した。構築された画像からネイル
周囲の骨新生及びガス発生量について計測した。計測方法は、計測領域を同じ
条件とするため、幅はネイルヘッド中心を基準にネイル外側から 1 mm 遠方まで
とし、高さはネイルの頭尾側からそれぞれ 1 mm の範囲の円柱形とした (図.

6)。限定した円柱の範囲内で CT 値の違いによって、ガス成分、骨、並びにネ
イル部分を抽出した。ガスは CT 値 20～40 HU、骨は 40～120 HU とした。ネ
イルはチタン合金とマグネシウム合金で CT 値に違いがあり、チタン合金の方
が高い CT 値を持っていた。そのため、チタン合金で 80～290、マグネシウム
合金では 45～80 HU の CT 値の範囲を設定し分離した。骨に関して既存骨と新
生骨では CT 値では同一の範囲であるが、境界は画像的に明確であり分離は容
易であった（図. 7）。この方法で各成分を 3 次元描出し、それらの 3 次元的配
置の経時的な変化を検討すると共に、ガスと新生骨、ネイルの体積を計測しそ
れらの経時的な変化も検討した。

10

（6）樹脂包埋と樹脂包埋とエネルギー分散型 X 線分析（EDX: Energy dispersive X-ray spectrometry）

マイクロ X 線 CT 撮影後、サンプルは、可及的にネイル移植部外の組織を除
去し、組織内水分をエタノールにて置換し、組織内のエタノールをパラフィン
と相溶性のある中間剤レモゾールにて置換を行い、Methyl methacrylate (MMA)
樹脂に包埋した。包埋後、骨の長軸方向でネイルの最大断面となる断面を作製

し、蒸着を行った後、EDXにて元素分析を行った。これは、EDXによる面
分析にて、ネイル周囲の反応による変化を元素分布の可視化によって評価を行
った。

4

5 (7) 非脱灰研磨標本による組織学的観察

6 EDX分析後、厚さ約100~200 μm まで研磨し、ヘマトキシリンエオジン染
7 色を行った。光学顕微鏡下にて組織観察を行い、既存骨、新生骨、反応によっ
8 て生じるガス像など1週、4週における各群での周囲にみられる組織の確認を
9 行った。

10

11 (8) 統計分析

12 統計分析は、JMP® Pro 14 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) を使用して実行
13 した。各群間の違いは、one-way ANOVA を用いて分析を行い、有意差を認めた
14 場合それに基づく Tukey-Kramer の事後検定を使用して評価した。 $p < 0.05$ で統計
15 的有意性を表すとした。

16

17

V 研究結果

1 マイクロ X 線 CT 画像とその 3 次元構築画像所見

1 週における代表的なマイクロ X 線 CT 画像 (図.8) と全例の 3 次元構築画像 (図.9) を示す。マイクロ X 線 CT 撮影画像では、全群において既存骨の明らかな吸収は認めなかった。裸材群、耐蝕層群、ブルシャイト群において骨外および骨髓腔内にネイル周囲に発生したガスによるものと思われる空孔が複数確認され、ネイルは耐蝕層群では外形に不整がみられた (図.8)。また、明らかな新生骨は各群ともに確認できなかった (図.8)。これらを 3 次元構築画像で確認すると、裸材群、耐蝕層群、ブルシャイト群において、既存骨の皮質側ネイルヘッド周囲と骨髓側ネイル周囲にそれらを取り巻くように存在するガスを認めた。CT 画像では離れて見えていた空洞が、3 次元構築すると一塊であることが確認できた (図.9)。全群において、新生骨は皮質側および髓腔側でわずかに確認できた (図.9)。対照群としてのチタン合金ではガスの発生は確認できなかった (図.9)。

次に 4 週における代表的なマイクロ X 線 CT 画像 (図.10) と全例の 3 次元構

1 築画像（図.11）を示す。4週ではマイクロX線CT画像において、耐蝕層群で
2 空孔形成が確認できたが、他のマグネシウム合金の2群では1週に比べて減少
3 していた（図.10）。マグネシウム合金の3群ともに新生骨形成がみられた
4 （図.10）。これらを3次元構築画像で確認すると、明らかに耐蝕層群において
5 他の群と比べ多くのガスがネイルヘッド及び骨髓内のネイルシャフト部分を取
6 り囲むように存在し、それらガスを囲むように新生骨が形成されている様子が
7 確認できた（図.11）。対照群のチタン群では、ネイル周囲にわずかな新生骨形
8 成のみを確認できた（図.11）。

9 1週と4週の3次元構築画像を比較すると、3つのマグネシウム合金群にお
10 いて、4週での新生骨の3次元的配置は、1週での巨大なガス部分が皮質側及
11 び骨髓側に接する表面に一致している可能性が示唆された（図.9, 11）。

12

13 2 非脱灰研磨標本による組織所見

14 上述した通り二次元でのCT像および三次元構築した立体像が示すものが、
15 実際に組織所見においてどのように認識できるのかを、非脱灰研磨標本にて、
16 図.12に示す。それぞれの1週、4週での代表症例を示している。図.12A-Bで

1 は、ガス像を認めず周囲との反応もほぼ認めない。一方で、図. 12C-H では、
2 ネイル周囲のガス像を認め、髄腔内にもガスが発生している事がわかった。ま
3 たネイル頭周囲に新生骨も認めている。

4 図. 13 は、1、4週におけるチタン合金ネイル周囲の組織所見を示してい
5 る。1週ではネイル周囲に薄い好塩基性の肉芽組織(Granulation tissue : GT)を認
6 める (図. 13A)。4週では線維性組織 (Fibrous connective tissue: FT) (図.
7 13B)、骨髓(Bone marrow: BM) (図. 13C) がみられるが、明らかな新生骨は認
8 めなかった。

9 図. 14 は、1、4週におけるマグネシウム合金 (耐蝕層) ネイル周囲の組織
10 所見を示している。1週では薄い好塩基性の無構造の腐蝕生成層 (Corrosion
11 product: CP) を耐蝕層表面に認める (図. 14A)。4週ではネイルの分解が進ん
12 でいるため外形形状が不規則で、ネイル周囲に海綿骨様の新生骨形成がみら
13 れ、マグネシウム合金の表面では腐蝕生成物 (Corrosion product: CP) を介して
14 新生骨(Newly formed bone: NB)が接しており、海綿骨間には疎な線維性組織
15 (Fibrous connective tissue: FT) を伴っていた (図. 14B)。また、図. 14C では周
16 囲に空孔形成 (Gas cavity: G) がみられた。

1

2 3 非脱灰研磨標本による EDX 所見

3 図 15 と図 16 は 4 週での合金周囲の組織における EDX のマッピング所見

4 を示している。関心領域をネイルシャフトの骨髓内部分とし、元素（Ti、N、

5 C、O、Mg、Ca、P）を同定した。

6 図. 15 は対照群であるチタン合金ネイルでの結果を示す。チタン合金表層に腐

7 蝕生成物と思われる元素の出現は見られず、次のマグネシウム合金に認めるよ

8 うな Ca を主体とした成分の析出は認めなかった。また、骨成分であるリン酸

9 カルシウムを示す Ca、P、O を含む組織も周囲に認められなかった。

10 一方、図.16 はマグネシウム合金（裸材群）のネイルでの結果を示した。マグ

11 ネシウム合金表面は腐蝕され、陥凹変形を来しており、同部位は Mg、C、P、

12 O を成分とする析出物（腐蝕生成物）に置き換わっていた。その表面に Ca、

13 C、O、P からなる別成分の析出物が薄く覆っている様子が確認された。この析

14 出物は炭酸酸カルシウムおよびリン酸カルシウムと考えられ、この層は厚いリ

15 ン酸カルシウムの構造物へと連続していた。この厚い構造物は、電子顕微鏡像

16 上、新生している骨組織であることが確認できた。結果には示さないが、他の

1 マグネシウム合金群においても同様の電子顕微鏡像および EDX 分析結果を示
2 した。

3

4 4 ガス体積の経時的変化

5 3 次元構築画像を用いたガス体積計測の結果を示す (表 1, 図. 17)。

6 1 週における各群間の比較では、One-way ANOVA において各群間に有意差を

7 認め($p=0.0022$)、post-hoc test において対照群であるチタン合金と他のマグネシ

8 ウム合金群において有意差を認めた (裸材群: $p=0.0256$ 、耐蝕層群: $p=0.0013$ 、

9 ブルシャイト群: $p=0.0454$) (図. 17)。実際の体積としては、耐蝕層群で 15.45

10 mm^3 と最も多い結果となった (表 1)。一方、マグネシウム合金群間ではガス体

11 積に差を認めるものの有意差は認めなかった(裸材群 vs 耐蝕層群: $p=0.1538$ 、裸材

12 群 vs ブルシャイト群: $p=0.9748$ 、耐蝕層群 vs ブルシャイト群: $p=0.0864$) (図.

13 17)。

14 4 週においても One-way ANOVA において各群間に有意差を認めたが

15 ($p=0.0104$)、post-hoc test ではチタン合金群との有意差を認めたのは耐蝕層との

16 みであり($p=0.0083$)、体積は 11.34 mm^3 であり、1 週と比較し減少していた

(表 1)。各マグネシウム合金群間では、耐蝕層群とブルシャイト群の間に有意差を認めた($p=0.0358$) (図. 17)。

5 新生骨体積量の経時的変化

3次元構築画像を用いた新生骨の体積計測の結果を示す (表 2, 図. 18)。

1週における比較では、One-way ANOVA において各群間に有意差を認めなかった($p=0.4839$) (図. 18)。4週では One-way ANOVA において各群間に有意差を認め ($p=0.0027$)、post hoc test において対照群であるチタン合金群と裸材群間 ($p=0.0373$) および、チタン合金群と耐蝕層群間 ($p=0.0023$)、各マグネシウム合金群間では、耐蝕層群とブルシャイト群間 ($p=0.0149$) においてそれぞれ有意差を認めた (図. 18)。実際の体積としては、チタン合金群 1.75 mm^3 、裸材群 5.40 mm^3 、耐蝕層群 7.73 mm^3 、ブルシャイト群 3.36 mm^3 であり (表 2)、耐蝕層群で最も骨形成が認められた。

6 ネイル体積の経時的変化

ネイルのみの吸収変化を視覚的に確認するため、ガスや新生骨像を除いた 4

1 週のネイルのみの 3 次元構築画像を作成した(図. 19)。チタン合金ネイルでは全
2 く形状変化を認めなかったが、各マグネシウム合金群では吸収による表面不整
3 を認めた。吸収による不整はネイル表面全体に認めたが、特に耐蝕層群におい
4 て不整は強く、既存骨に接している部分において著明に観察された。

5 ネイルの吸収を経時的に比較検討するため、3 次元構築画像よりネイルの体積
6 を計算した (表 3, 図. 20)。チタン合金群では体積の変化をほぼ認めなかつ
7 た。1 週における各群間の比較では、One-way ANOVA において各群間に有意差
8 を認め($p=0.0003$)、post-hoc test において、移植前のネイル体積と同等と考えら
9 れるチタン合金群と裸材群($p=0.0011$)、耐蝕層群($p=0.0004$)、ブルシャイト群
10 ($p=0.0009$)に有意差を認めた(図. 20)。実際のネイル体積としては、チタン合金
11 群 5.69 mm^3 、裸材群 4.46 mm^3 、耐蝕層群 4.25 mm^3 、ブルシャイト群 4.42 mm^3
12 であり(表 3)、耐蝕層群で最も吸収が認められた。各マグネシウム合金群間に
13 有意差は認めなかった(裸材群 vs 耐蝕層群: $p=0.7260$ 、裸材群 vs ブルシャイト
14 群: $p=0.9968$ 、耐蝕層群 vs ブルシャイト群: $p=0.8375$)。

15 4 週においても、One-way ANOVA において各群間に有意差を認め
16 ($p=0.0001$)、post-hoc test において、チタン合金群と各マグネシウム合金群間に

1 おいては、裸材群($p=0.0024$)、耐蝕層群($p<0.0001$)、ブルシャイト群($p=0.0012$)
2 と有意差を認めた(図. 20)。各マグネシウム合金群間での比較では、耐蝕層群が
3 裸材群($p=0.0403$)、ブルシャイト群($p=0.0976$)となり裸材群とのみ有意差を認め
4 た。実際のネイル体積としては、チタン合金群 5.51 mm^3 、裸材群 4.42 mm^3 、耐
5 蝕層群 3.76 mm^3 、ブルシャイト群 4.30 mm^3 であり(表 3)、4 週においても耐
6 蝕層において体積の減少が顕著であった。

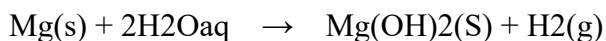
7

VI 考察

近年になり再びマグネシウム合金の医療応用が注目を集めている。今回の研究では、表面処理を行っていないマグネシウム合金の裸材と耐蝕層を表面処理した合金、耐蝕層上にブルシャイトにて表面処理した合金、加えてコントロールとしてのチタン合金を用いて比較検討した。

これまでの2次元的な検討では生体内におけるマグネシウム合金の反応に伴うガス発生は、CT画像で評価した図. 8、10で示すようにネイル周囲に空隙を伴う部分としてこれまで認識されてきた。同部分は病理組織所見では、図.12にあるような空孔として観察される。これまでは、それぞれの一断面による考察であったが、今回平面において個別に生じているように見えた空隙は、立体構築することで連続性を持った一連のガスであることが明確となった

(図.9,11)。また、ガスはネイル頭周囲及び既存骨表面、髄腔内に存在しておりその局在についても確認する事ができた。これまで、腐蝕反応により生じる水素ガスは、



1 の反応で発生し、速やかに吸収される⁽⁹⁾との報告がある一方で、反応が早い場
2 合は皮下に空洞を形成する可能性がある⁽⁹⁾とされていた。しかし、空隙内のガ
3 ス成分の分析では、二酸化炭素 5.6%、酸素 6.5%、水素 7.3%、窒素 80.6%と報
4 告されており、実際は大気中のガス成分と近いことが示されている⁽⁹⁾。この事
5 から、合金周囲に発生する水素は周囲組織へ速やかに吸収や拡散するものの、
6 その間隙は保たれ内容ガス成分は大気と入れ替わっている可能性が考えられ
7 た。マグネシウム合金がその周辺において血管新生や骨形成を促進している⁽²⁹⁾
8 との報告もみられるため、これらの過程が、機序は不明であるが、ガス周囲組
9 織への血管新生や骨形成を促進している可能性はあると考えている。我々の研
10 究においても、ネイル合金、ガス、新生骨の局在を三次元的に確認すると、図
11 9, 11 に見るように、ガス周囲に骨新生が生じてきていることが確認できる。
12 次に表面処理による反応の違いを検討した。

13 ガスによる空隙の体積は4週において、耐蝕層群とブルシャイト群間で統計
14 的有意差をもって耐蝕層群が多い結果であった。一方、計測されたガス量はい
15 ずれの表面処理を施したマグネシウム合金においても4週の時点で1週よりも
16 減少しており、マグネシウム合金の生体内反応のピークは4週よりも前で起き

1 ており以降はなだらかに経過していると考えられる。また、先述した通りマグ
2 ネシウム合金の生体内反応のピークは 24 時間程度で起きており⁽²⁷⁾、これは本
3 研究における裸材群の反応を考えると、裸材群での反応のピークは 1 週よりも
4 前にあると言える。つまり、裸材においては埋植直後に急激な反応が起こり、
5 マグネシウム合金周囲に反応性の腐蝕生成物が付着することでガス発生を含め
6 て反応が鎮静化していく。ガス発生量は、マグネシウム合金が周囲と反応す
7 る事で発生するため、我々の結果を見ると耐蝕層群においてブルシャイト群よ
8 りも 4 週において反応が強く起きていると考えられた。また、同じく 4 週での
9 ガス発生量に関して裸材群との有意差を認めていないものの、裸材群と比べて
10 ガス体積は多い傾向がグラフ（図 1 7）より見てとれる。つまり、耐蝕層群で
11 は裸材群およびブルシャイト群と比べて吸収反応が遷延しているためにガス発
12 生量が多くなっている可能性が示唆された。これは、仮説として検討した結果
13 とは異なっている。裸材での反応を制御するために、耐蝕層を用いたが結果と
14 しては反応が遷延し、ガス体積が多くなる結果となった。

15 次に骨形成について考察する。ガス体積と同様に、4 週の時点で耐蝕層群とブ
16 ルシャイト群間で有意差を認め、耐蝕層群で多くの新生骨が形成されていた。

1 耐蝕層群は長期間に渡り周囲と反応していると思われ、その結果として多くの
2 骨形成が生じたものと考えられた。骨伝導性を有するブルシャイト群を用いる
3 事で、骨形成に関して有意に働くと考えたが、実際はガス体積および骨形成量
4 共に最小となる結果であった。これら骨形成の機序は依然不明であるが、いず
5 れにしてもマグネシウム合金の吸収反応が持続するほど骨形成量が増える可能
6 性が示された。

7 ネイルの体積量変化の検討では、強い反応は移植後早期にのみ起こりその後
8 鎮静化をしていると考えている裸材群と比較し、耐蝕層群で有意差をもって4
9 週での体積の減少が大きかった。これは吸収反応が耐蝕層群は裸材群に比べて
10 顕著であるといえる。また、立体的な形態変化においても耐蝕層においてネイ
11 ルの吸収に伴う不整は他群に比べ強く見て取れる（図19）。ネイル体積につ
12 いては検討する事で、それぞれの期間における反応強度が検討できるようにな
13 った。その結果、当初耐蝕層の方が裸材よりも安定していると考えていたが、
14 実際は反応が強く持続している可能性が示された。

15 以上の結果から推察されるのは表面処理を施すことによって裸材で起こりう
16 る反応のピークと強さを変える事ができるのではないかということである。つ

1 まり、裸材における反応のピークを時間軸では右方向に、反応強度ではなだら
2 かな方向へ変える事が表面処理の種類によって可能となるのではないかという
3 ことである。我々の考える表面処理による吸収反応の違いを模式図として図.21
4 に示す。本研究においては、裸材において、早期に強い反応が起こり、その後
5 速やかに鎮静化していく。それに対して、耐蝕層群では反応のピークは表面処
6 理によりずれた上で裸材よりは反応強度は低い、高い位置での反応が遷延し
7 ている。一方、ブルシャイト群においては、反応ピークが耐蝕層同様に右へず
8 れると共に、反応強度もいずれの二つよりも低く持続する事ができる可能性が
9 示唆された。

10 これまでマグネシウム合金への表面処理については、

11 ① 腐蝕反応を抑制させる事

12 ② 骨形成が促進する

13 ③ 生体適合性が高まる

14 に焦点があたり報告されてきた⁽²⁹⁾。しかし今回の研究から、表面処理の機能と
15 して、生体内での反応を目的に応じて調整できる可能性が新たに示された。つ

16 まり、生体内骨固定材料として、安定した挙動を目指すためには反応強度をな

1 だらかにし、よりそのピークを時間軸で右方向にずらすこと（本研究ではブ
2 ルシャイト）であり、早期の反応を期待する場合にはその逆を行えば良い
3 （本研究では裸材）と考える。また、骨形成を目的とするならば、一定の反応
4 が長時間持続すること（本研究では耐蝕層）である。この骨形成に関する推
5 察として、図.21 で示したそれぞれの反応の積分が概ね新生骨の量と類似して
6 いるのではないかと考え、今後のマグネシウム合金及び表面処理の選択におい
7 て一つの指標とすることができるのではないと思われる。

8 本研究においては多くの限界と問題点が内在する。はじめに、左右の脚に異
9 なるマグネシウム合金を埋植した事による周囲並びに、血中 Mg 濃度への影響
10 である。この点に関して、先行実験で Satou らが報告した通り筋組織を含む周
11 囲で均衡が保たれ、本実験の期間における影響は少ないと考えられた⁽²⁷⁾。し
12 かし、正常な個体での反応であり、今後 Mg が主に腎臓から排泄される事を考
13 慮すると、腎不全における検討も必要かと思われる。次に、各群の n 数の問題
14 が挙げられる。今回、各群の n は 3 と最小の数で行わざるを得なかった。各群
15 の n 数を増やせば有意差がでる項目も増えた可能性がある。また、三次元画像
16 の構築において、CT の撮影条件の関係で CT 値に近い既存骨と新生骨やネイル

1 と腐蝕生成物を分離する際に組織標本や二次元の CT 画像を参照に人為的に境
2 界を決める必要が生じた部位が存在した。その点において客観性、再現性を欠
3 く可能性がある。今回、画像構築作業は数回行われ、毎回安定した画像が構築
4 できるようになった後にそれを解析した。また、本研究において組織学的評価
5 や EDX 分析を行うために、各観察点において検体の屠殺を行わざるを得なか
6 った。そのため、同一個体における CT 像を経時的に追うことはできず、ガス
7 の発生部位と骨新生部位の経時的变化と関係を厳密に評価することはできなか
8 った。最後に、今回反応によって骨形成が生じる機序について、様々なサイト
9 カインや骨代謝マーカーの局在を検討することができなかった。また骨形成の
10 機序を血管新生の観点からも分析していくこともできていない。これらは今後
11 の課題として次の研究に継続してゆきたい。

12

VII 結論

本研究において、表面処理の種類によってマグネシウム合金の生体内挙動が変化することが明らかになった。また、マグネシウム合金による骨形成と吸収反応の関連も示唆された。これにより表面処理がマグネシウム合金の生体内挙動を制御・調整できる可能性が示された。

我々の研究は、生体吸収性と十分な強度に加えて骨形成能を持つ新たなマグネシウム合金による骨固定材料開発への表面処理の意義と可能性を示したものと考える。

VIII 謝辞

終わりに臨み、終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました東北大学大学院医学系研究科 外科病態学講座 形成外科学分野の館正弘教授に深い謝意を表します。本研究の遂行にあたり、終始忍耐強いご指導をいただきました東北大学大学院 歯学研究科 口腔病理学分野の清水良央先生に厚く感謝の意を表します。また終始ご指導、ご討論をいただきました東北大学大学院 医学系研究科 外科病態学講座 形成外科学分野の今井啓道准教授に感謝致します。神戸大学大学院 工学研究科の向井敏司教授には、本研究で用いたマグネシウム合金のご提供をいただき、工学的視点から多くのご教授をいただきました。日本パーカライジング株式会社の村上様始め企業の方には、本研究でのマグネシウム合金への表面処理を行っていただき、研究の多様性を引き出していただきました。東北大学大学院 歯学研究科 口腔病理学分野の熊本裕行教授と佐野有哉先生、及川美穂さんには実験方法のご指導とご協力をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

そしてご支援いただいた東北大学大学院 医学系研究科外科病態学講座 形

- 1 成外科学分野および東北大学病院 形成外科、ならびに東北大学大学院 歯学
- 2 研究科 口腔病理学分野の皆様にご挨拶いたします。
- 3 本研究は、日本学術振興会科研費（17907147）の助成を受けておこないまし
- 4 た。
- 5

IX 文献

1. Luhr HG : A Micro-System for Cranio-Maxillofacial Skeletal Fixation Preliminary Report. J Craniomaxillofac Surg. 1988 Oct;16(7):312-4.
2. Per-Ingvar Branemark : Osseointegration and its experimental background. J Prosthetic Dentistry. 1983 Sep;50(3) : 399-410
3. Chen Q, Thouas GA : Metallic implant biomaterials. Materials Science and Engineering: R: Reports. 2015;87:1-57.
4. Niinomi M, Nakai M, Hieda J : Development of new metallic alloys for biomedical applications. Acta biomaterialia. 2012;8(11):3888-903.
5. Kammer C : Magnesium Taschenbuch. Düsseldorf: Aluminium-Verlag; 2000.
6. Huse EC : A new ligature? Chicago Med J Exam 1878:172-2.
7. Seelig MG : A study of magnesium wire as an absorbable suture and ligature material. Arch Surg 1924;8(2):669-80.
8. Lespinasse VD : A practical mechanical method of end-to-end anastomosis of blood-vessels: using absorbable magnesium rings. JAMA 1910;55:1785-90.

- 1 9. McBride ED : Magnesium screw and nail transfixion in fractures. South
2 Med J 1938;31(5):508-15.
- 3 10. Nagase DY, Courtemanche DJ, Peters DA : Plate removal in traumatic
4 facial fractures: 13-year practice review. Annals of Plastic Surgery.
5 2005;55(6):608-11.
- 6 11. Witte F, Ulrich H, Palm C, et al : Biodegradable magnesium scaffolds:
7 part II: peri-implant bone remodeling. J Biomed Mater Res A. 2007
8 Jun 1;81(3):757-65.
- 9 12. Johnson I, Liu H : A study on factors affecting the degradation of
10 magnesium and a magnesium-yttrium alloy for biomedical applications.
11 PLoS One. 2013 Jun 14;8(6).
- 12 13. Colnot C, Zhang X, Knothe Tate M L : Current insights on the
13 regenerative potential of the periosteum: molecular, cellular, and
14 endogenous engineering approaches. J Orthop Res. 2012
15 Dec;30(12):1869-78.
- 16 14. Zhai W1, Lu H, Wu C, et al : Stimulatory effects of the ionic products

from Ca-Mg-Si bioceramics on both osteogenesis and angiogenesis in
vitro. *Acta Biomater.* 2013 Aug;9(8):8004-14.

15. Yoshizawa S, Brown A, Barchowsky A, et al : Magnesium ion stimulation
of bone marrow stromal cells enhances osteogenic activity, simulating
the effect of magnesium alloy degradation. *Acta Biomater.* 2014
Jun;10(6):2834-42.

16. Chaya A, Yoshizawa S, Verdelis K, et al : In vivo study of magnesium
plate and screw degradation and bone fracture healing. *Acta Biomater.*
2015 May;18:262-9.

17. Witte F, Hort N, Vogt C, Cohen S, et al : Degradable biomaterials
based on magnesium corrosion. *Curr Opin Solid State Mater* 2008;12:63-
72.

18. Hermawan H, Dube D, Mantovani D : Developments in metallic
biodegradable stents. *Acta Biomater.* 2010 May;6(5): 1693-97.

19. Mao L, Shen L, Chen J, Wu Y, et al : Enhanced bioactivity of Mg-Nd-
Zn-Zr alloy achieved with nanoscale MgF₂ surface for vascular stent

1 application. ACS Appl Mater Interfaces. 2015 Mar 11;7(9):5320-30.

2 20. Lin Mao, Li shen, Jiahui Chen, et al : A promising biodegradable
3 magnesium alloy suitable for clinical vascular stent application.

4 Sci Rep. 2017 Apr 11;7:46343

5 21. Yoshida T, Fukumoto T, Urade T, et al : Development of a new
6 biodegradable operative clip made of a magnesium alloy: Evaluation
7 of its safety and tolerability for canine cholecystectomy. Surgery.
8 2017 Jun;161(6):1553-1560.

9 22. Urade T, Yoshida T, Ikeo N, et al : Novel biodegradable magnesium
10 alloy clips compared with titanium clips for hepatectomy in a rat
11 model. BMC Surg. 2019 Sep 9;19(1):130.

12 23. Gu X-N, Zheng Y-F : A review on magnesium alloys as biodegradable
13 materials. Front. Mater. Sci. China 4 111-5

14 24. Poinern GEJ, Brundavanam S, Fawcett D : Biomedical magnesium alloys:
15 a review of material properties, surface modifications and potential
16 as a biodegradable orthopaedic implant. Am J Biomed Eng

2012;2(6):218-240.

25. Hase T, Ikeo N, Mukai T, et al : Effect of aluminum or zinc solute addition on enhancing impact fracture toughness in Mg-Ca alloys. *Acta Materialia* 104 , 283-294

26. Miura, C., Shimizu, Y., Imai, Y., et al; In vivo corrosion behaviour of magnesium alloy in association with surrounding tissue response in rats *Biomed Mater.* 2016 11(2):025001.

27. Sato A, Shimizu Y, Imai Y, et al : Initial organ distribution and biological safety of Mg²⁺ released from a Mg alloy implant. *Biomed Mater.* 2018 Mar 6;13(3):035006.

28. Shadanbaz S1, Walker J, Woodfield TB, et al : Monetite and brushite coated magnesium: in vivo and in vitro models for degradation analysis. *J Mater Sci Mater Med.* 2014 Jan;25(1):173-83.

29. Gomes PS, Zomorodian A, Kwiatkowski L, et al : In vivo assessment of a new multifunctional coating architecture for improved Mg alloy biocompatibility. *Biomed Mater.* 2016 Aug 10;11(4):045007.

1 30. Sschiko HIROMOTO : Surface Modification of Biodegradable Magnesium

2 Alloys. J. Surf. Finish. Soc. Jpn. 2018;69(8) p323-328

3

4

5

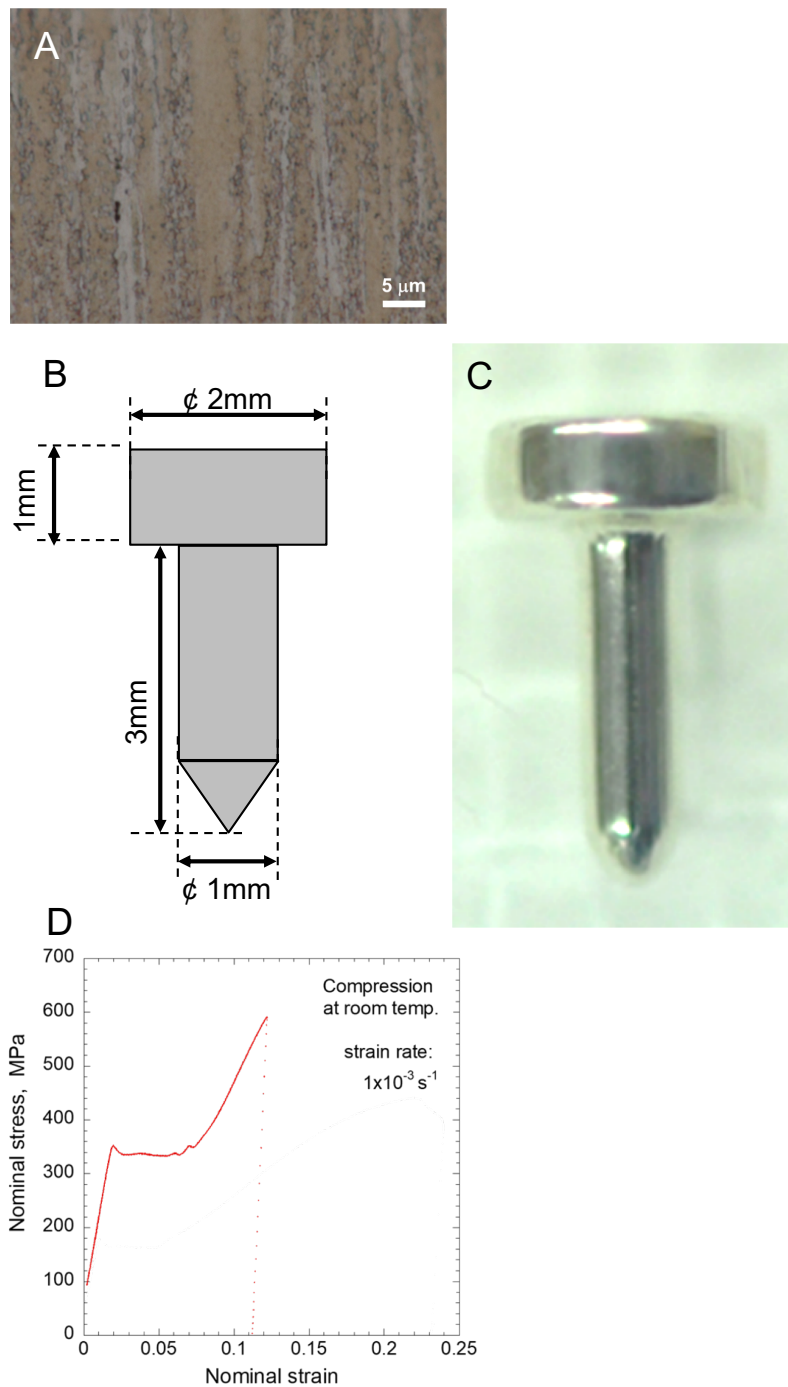


図1. ネイルのプロファイル

A：ネイル素材の内部結晶組織（光学顕微鏡観察）（向井先生より提供）

B：ネイルの形状および寸法。頭部は $\phi 2\text{mm}$ 、シャフトは $\phi 1\text{mm}$ 、
長さは頭部の高さ1mmを含めて4mm。

C：全体図

D：ネイル素材の圧縮変形特性

（試験温度：室温，ひずみ速度： $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ）（向井先生より提供）

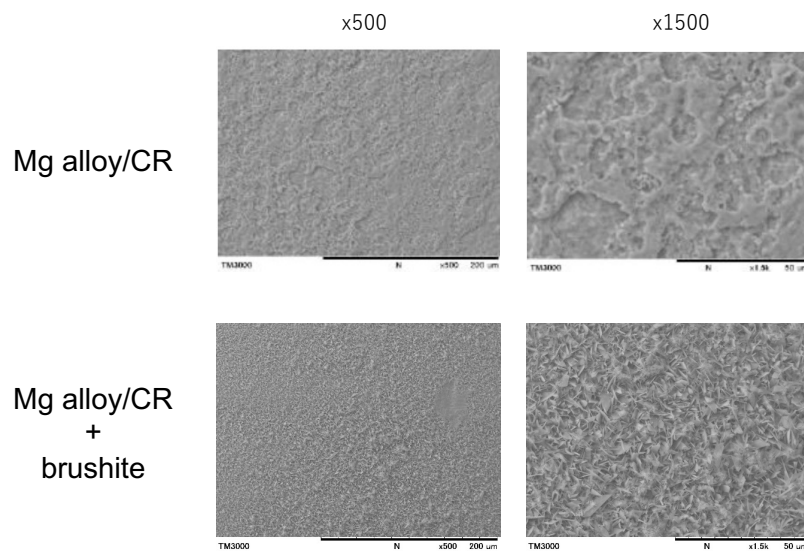


図2. Mg合金マグネシウム合金表面処理ネイルのプロファイル
 A : 耐蝕層 500倍 B : 耐蝕層 1500倍 C : ブルシャイト 500倍
 D : ブルシャイト 1500倍

A-Dそれぞれ均一に表面処理が行なわれている。

Mg alloy/CR : 耐蝕層 Mg alloy/CR+brushite : ブルシャイト

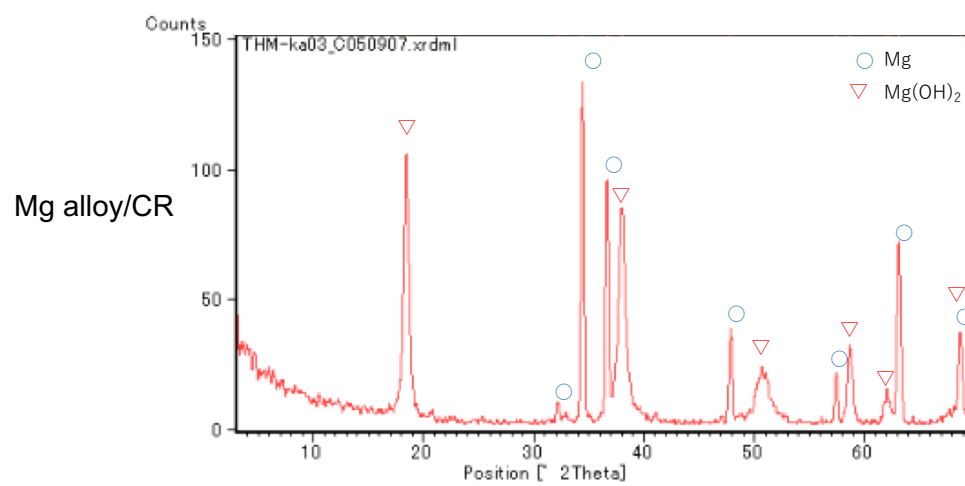


図3. 耐蝕層表面のX線回析法

マグネシウム、水酸化マグネシウムが検出され表面にコーティングされている事がわかる。

Mg alloy/CR : 耐蝕層

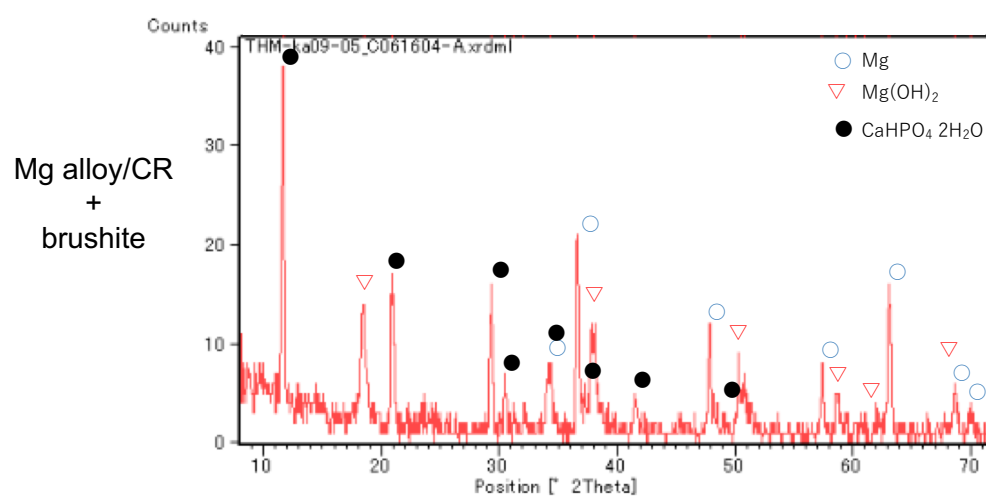


図4. ブルシャイト表面のX線回析法
マグネシウム、水酸化マグネシウムに加えてリン酸カルシウムが
検出され表面にコーティングされている事がわかる。

Mg alloy/CR+brushite : ブルシャイト

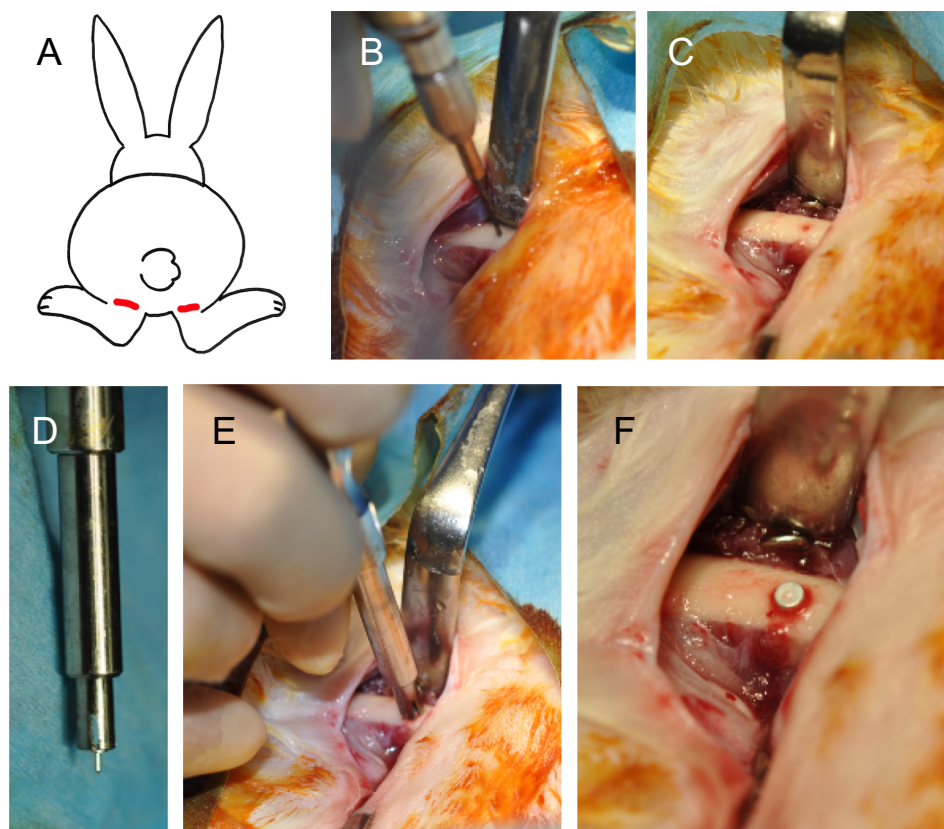


図5. 手術手技.

A : 大腿部後部の皮膚切開（赤線）

B : 大腿骨露出および骨孔作成

C : 骨孔作製後 D : アダプターによるネイル把持

E : アダプターを使用してタップせずに骨孔にネイルを挿入

F : 大腿骨にネイルを埋殖

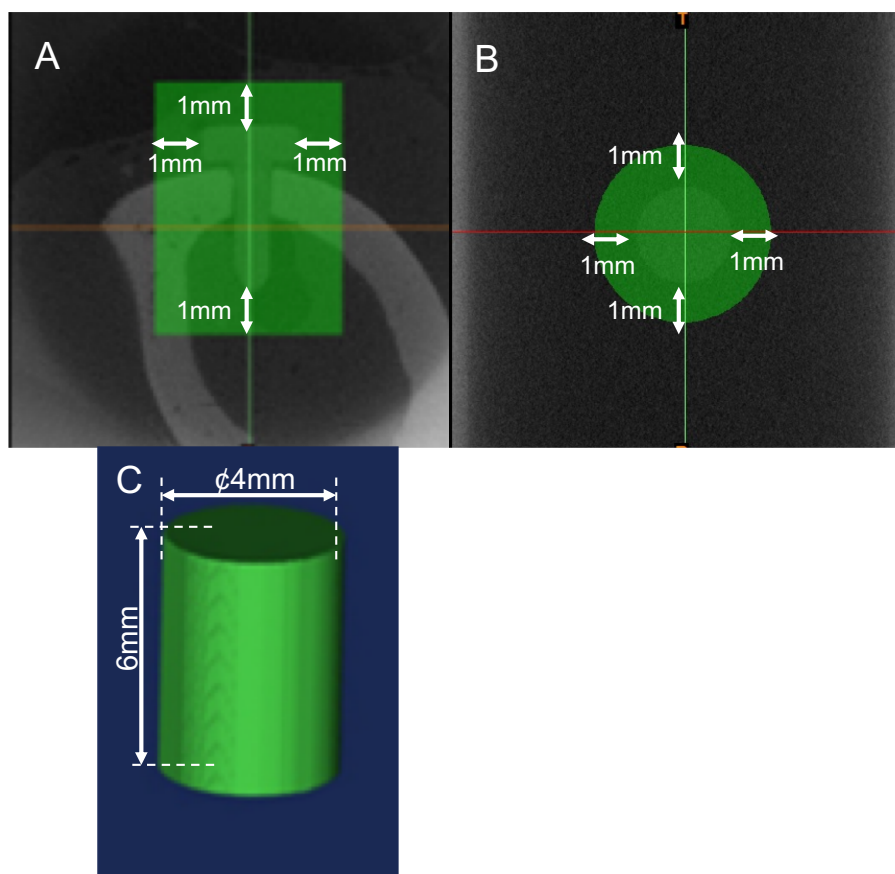


図6. CT画像の3D測定（緑）の対象範囲。
A：冠状断　　B：軸位断　　C：3D画像内の円柱状の対象範囲。

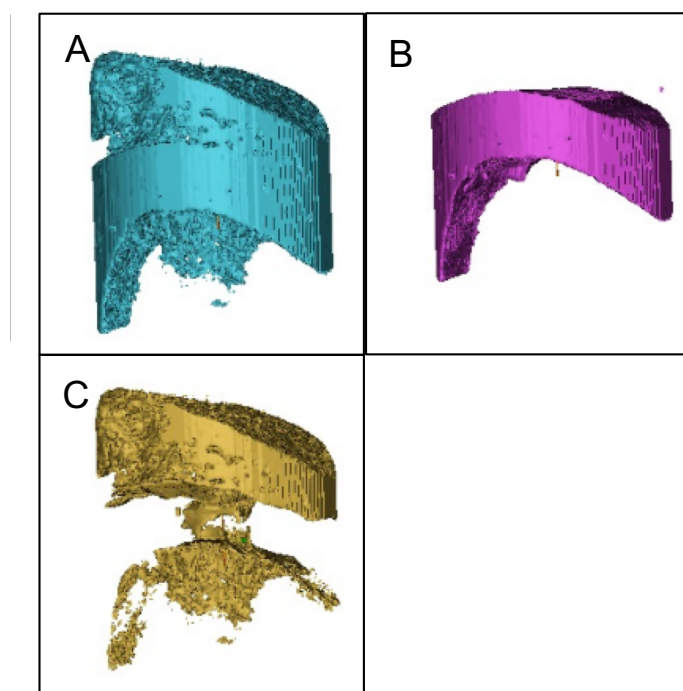


図7. 3D画像での新生骨の抽出

A：すべての骨成分（青）

B：既存の大腿骨の骨（紫）

C：新生骨（黄色）はA-Bとして計算した。

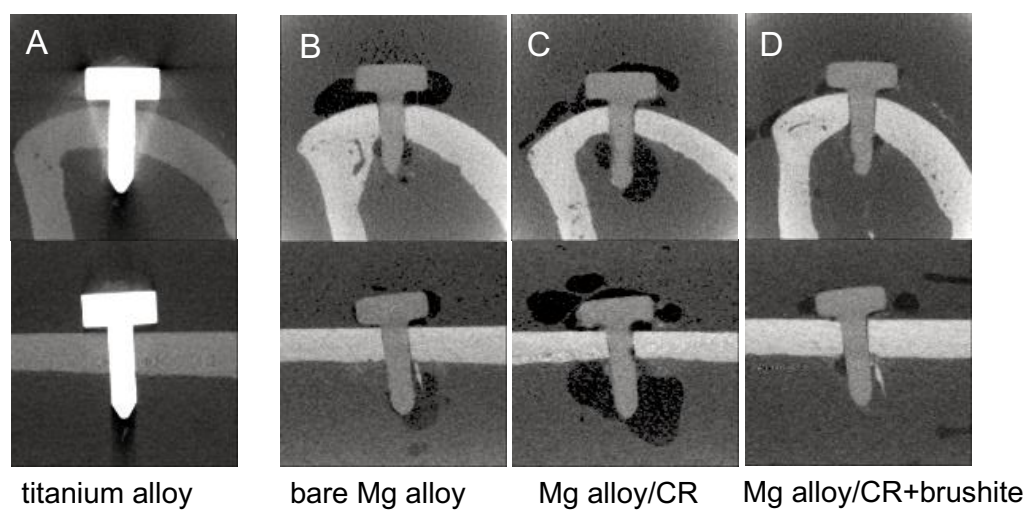


図8. 1週でのCT図

A: チタン(titanium alloy) B: 裸材(bare Mg alloy)
 C: 耐蝕層(Mg alloy/CR) D: ブルシャイト(Mg alloy/CR+brushite)

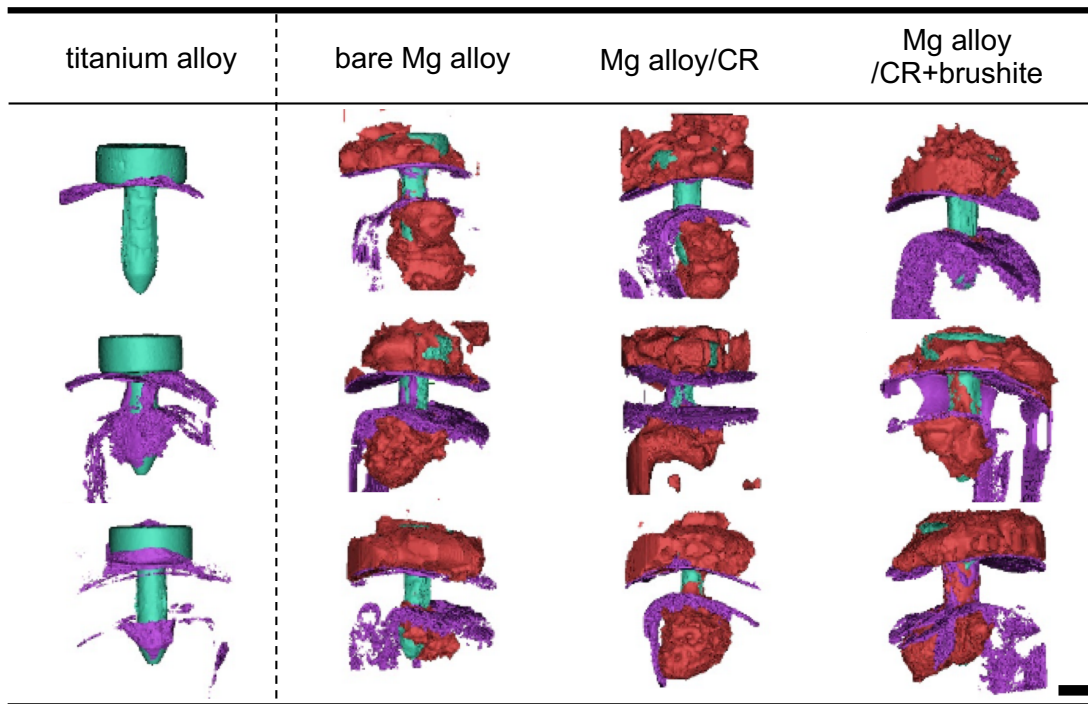


図9. 1週における三次元構築画像
合金（ターコイズ）、新生骨（紫）、ガス（赤）、スケールバー：1mm.

titanium alloy: チタン bare Mg alloy: 裸材
Mg alloy/CR: 耐蝕層 Mg alloy/CR+brushite: ブルシャイト

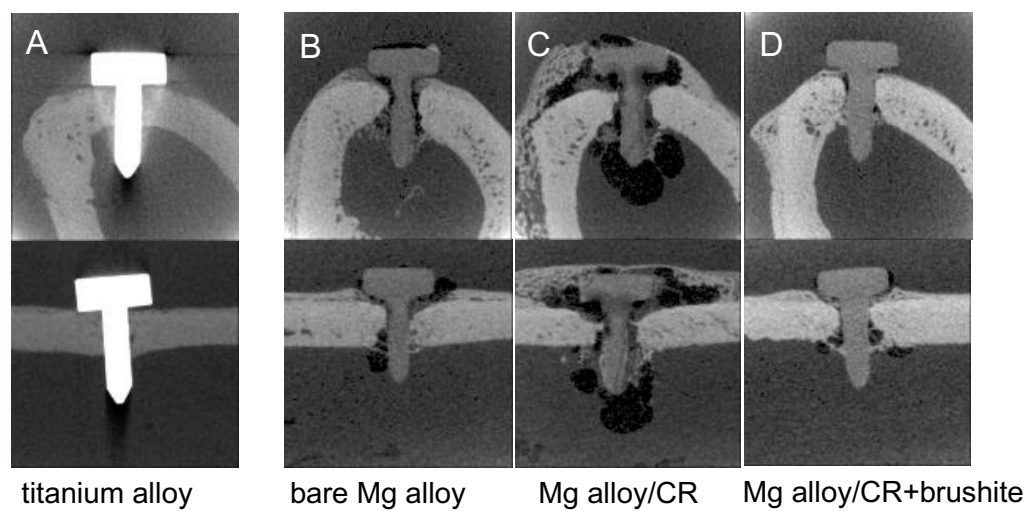


図10. 4週でのCT図

A: チタン(titanium alloy) B: 裸材(bare Mg alloy)
 C: 耐蝕層(Mg alloy/CR) D: ブルシャイト(Mg alloy/CR+brushite)

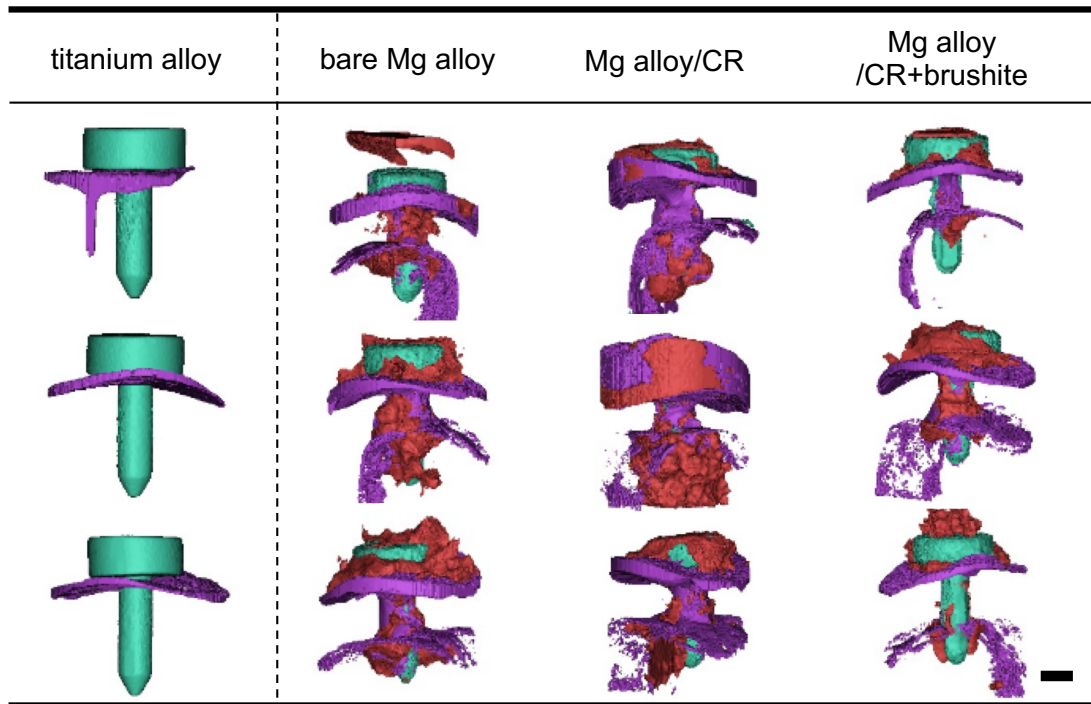


図11. 4週における三次元構築画像
合金（ターコイズ）、新生骨（紫）、ガス（赤）、スケールバー：1mm.

titanium alloy: チタン bare Mg alloy: 裸材
Mg alloy/CR: 耐蝕層 Mg alloy/CR+brushite: ブルシヤイト

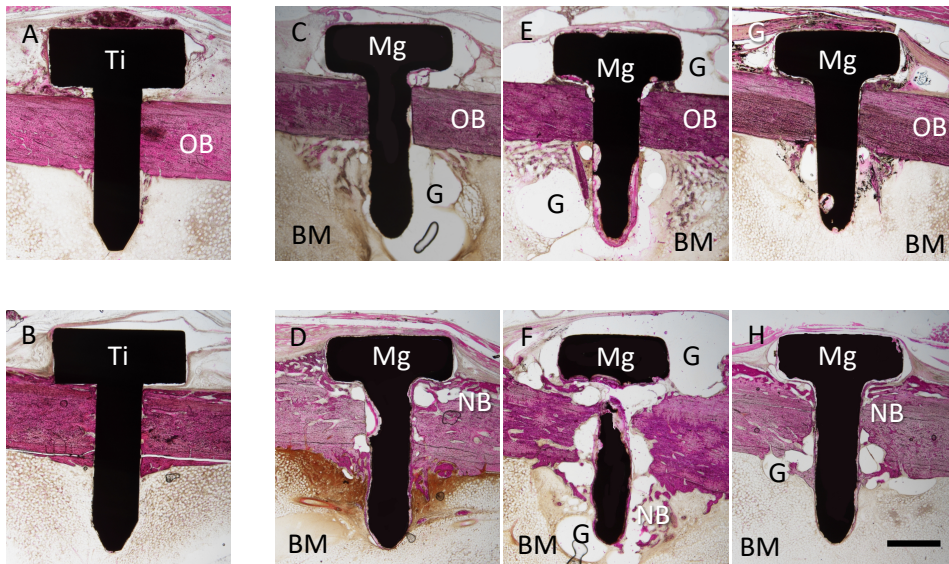


図12. 1,4週における非脱灰研磨標本

A: チタン 1W B: チタン 4W C: 裸材 1W D: 裸材 4W,
E: 耐蝕層 1W F: 耐蝕層 4W G: ブルシャイト1W, H: ブルシャイト 4W
スケールバー: 100um

Ti: チタン合金 Mg: マグネシウム合金 OB: 既存骨
BM: 骨髄 NB: 新生骨 G: 空孔

A-Bでは、ガス像を認めず周囲との反応もほぼ認めない。
C-Hでは、ネイル周囲にガス像を認める。髄腔内にもガス像を認める。
D, F, Hにおいて、ネイル頭周囲に新生骨を認める。

1
2

図 13

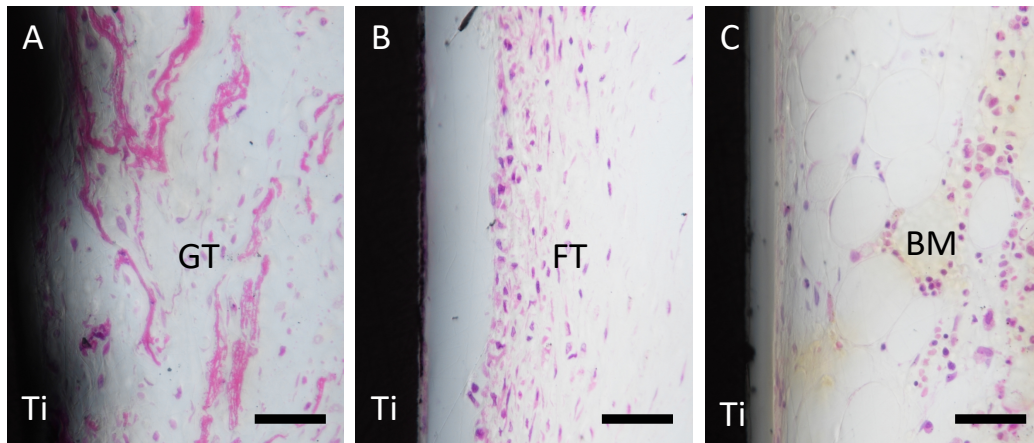


図13. 1, 4 週でのチタン合金周囲の代表的な組織所見

A: 1 週 肉芽組織がみられる。

B: 4 週 線維性組織がみられる。

C: 4 週 骨髄組織がみられる。 スケールバー：50 μ m

Ti: チタン合金 GT: 肉芽組織 FT: 線維性組織 BM: 骨髄 ,

新生骨は、1、4 週において病理組織上は認めなかった。

3

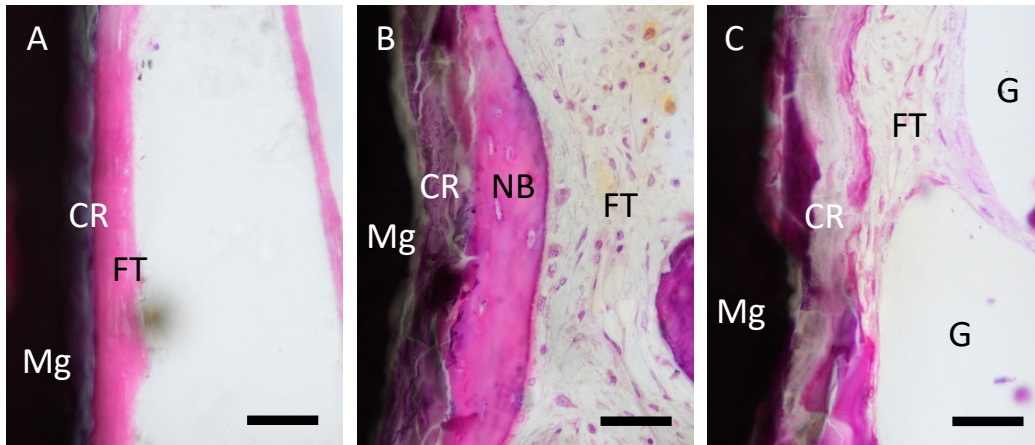


図14. 1, 4週でのMg合金マグネシウム合金（耐蝕層）周囲の代表的な組織所見

A: 1週 薄い好塩基性の無構造の腐蝕生成層がみられる。

B: 4週 ネイルの分解のため外形形状が不規則となっている。

腐蝕生成物を介して新生骨が接している。

C: 4週 周囲に空孔形成がみられた。 スケールバー：50 μ m

Mg: マグネシウム合金 CR: 耐蝕層 CP: 腐蝕生成物 NB: 新生骨

FT: 線維性組織 G: 空孔

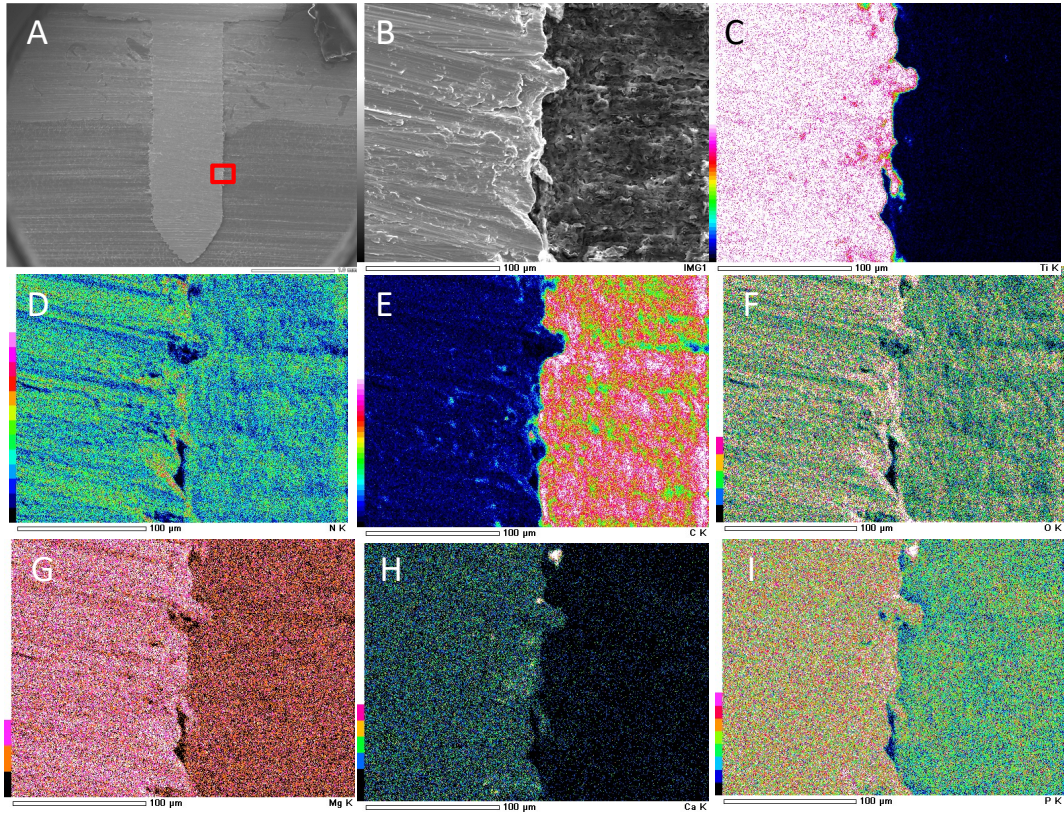


図15. チタン合金での4週間でのネイルシャフト周囲の代表的なEDX所見
 A: 透過型電子顕微鏡像、EDXの関心領域を赤枠で示す
 B: 関心領域の拡大像
 C～I: EDX 元素マッピング像 (順にTi, N, C, O, Mg, Ca, P)

腐蝕生成物と思われる元素の出現を認めなかった。
 Ti合金の周囲にCaを主体とした成分の析出は認めなかった。
 骨成分であるリン酸カルシウムを示すCa、P、Oを含む組織も周囲に認められなかった。

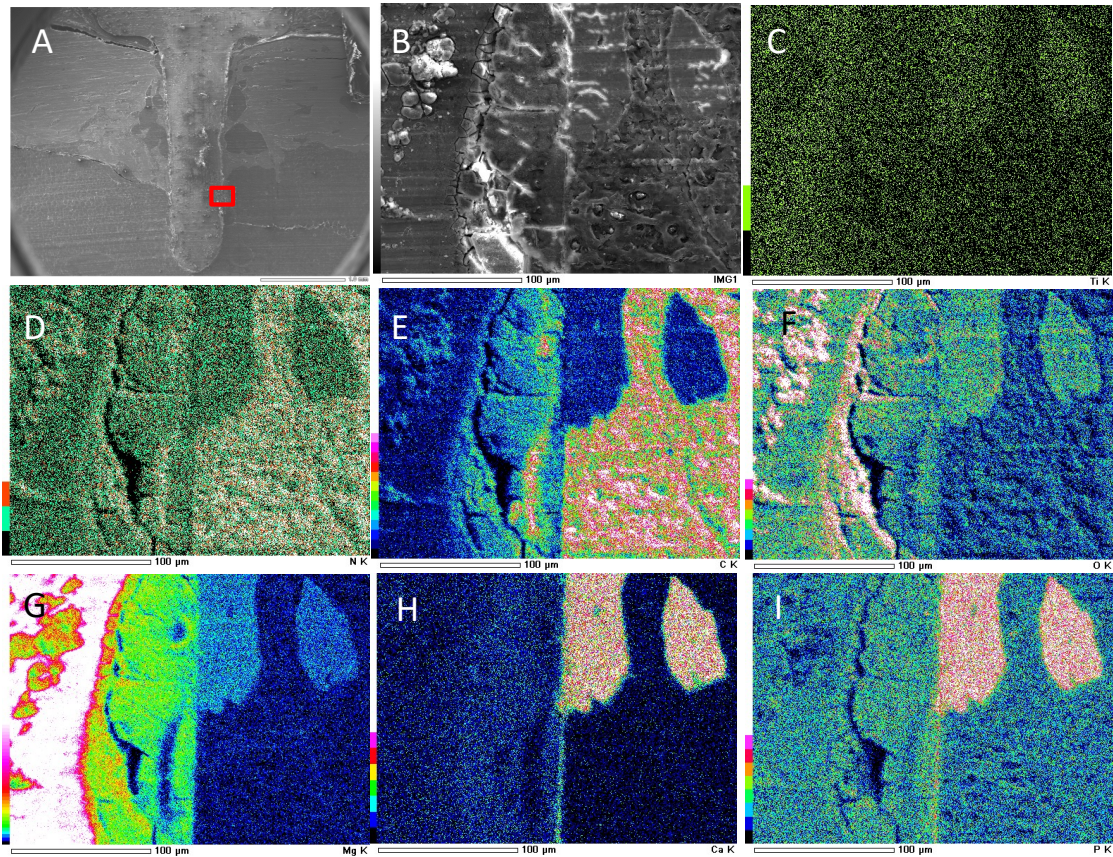


図16. マグネシウム合金（裸材群）の4週間でのネイルシャフト周囲の
代表的なEDX所見

A: 透過型電子顕微鏡像、EDXの関心領域を赤枠で示す

B: 関心領域の拡大像

C～I: EDX 元素マッピング像（順にTi, N, C, O, Mg, Ca, P）

GのMgマッピングにおいてマグネシウム合金は腐蝕され、陥凹変形を来している。
同部位はMg, C, P, Oを成分とする腐蝕生成物に置き換わり、その表面に
Ca, C, O, Pからなる別成分の生成物が薄く覆っている様子が確認される。
その一部は厚くなり、電子顕微鏡像上、新生している骨組織へと連続している。

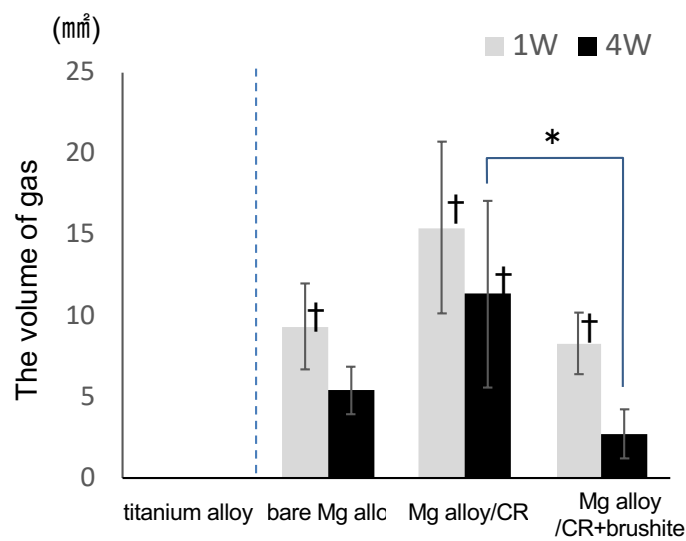


図17. 3次元構築画像を用いたガス体積の変化
値は平均±SDとして表しています。† *: p 値 < 0.05, n=3

One-way ANOVAにて分析し有意差を認めた際、post-hoc法で判定した。

1週:One-way ANOVA (p=0.0022) 各群間をpost-hoc法で判定

4週:One-way ANOVA (p=0.0104) 各群間をpost-hoc法で判定

titanium alloy: チタン bare Mg alloy: 裸材

Mg alloy/CR: 耐蝕層 Mg alloy/CR+brushite: ブルシャイト

†:チタンと同時期において有意差を認める。

*:マグネシウム合金間での有意差を表している。

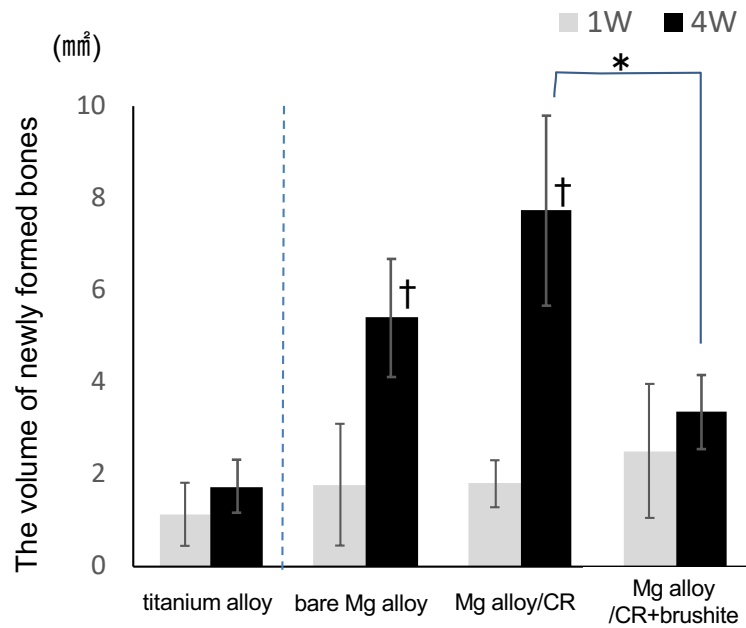


図18. 3次元構築画像を用いた新生骨量の変化
値は平均±SDとして表しています。† *: p 値 < 0.05, n=3

One-way ANOVAにて分析し有意差を認めた際、post-hoc法で判定した。

1週:One-way ANOVA (p=0.4839) 各群間で有意差認めず

4週:One-way ANOVA (p=0.0027) 各群間をpost-hoc法で判定

titanium alloy: チタン bare Mg alloy: 裸材

Mg alloy/CR: 耐蝕層 Mg alloy/CR+brushite: ブルシャイト

†:チタンと4週において有意差を認める。

*:マグネシウム合金間での有意差を表している。

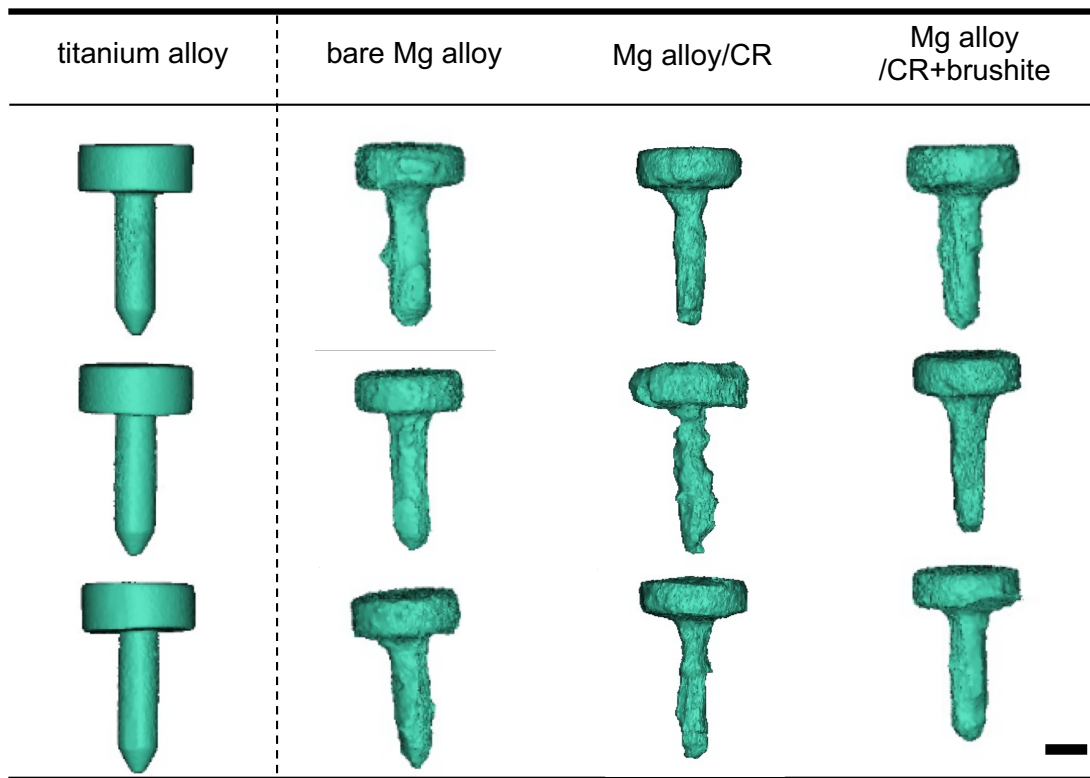


図19. 4週におけるネイルの3次元形態

titanium alloy: チタン bare Mg alloy: 裸材

Mg alloy/CR: 耐蝕層 Mg alloy/CR+brushite: ブルシャイト

スケールバー: 1mm.

耐蝕層においてネイル外形の不整を顕著に認める。

マグネシウム合金自体の形状は保たれている。

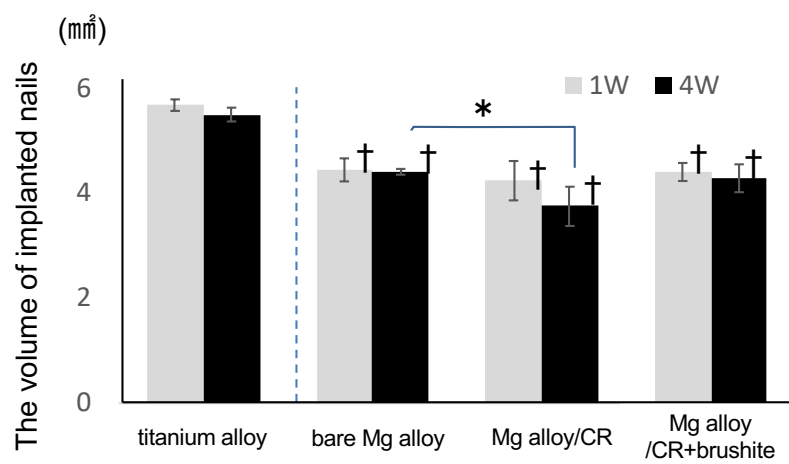


図20. 3次元構築画像を用いたネイル体積の変化
値は平均±SDとして表しています。† *: p 値 < 0.05, n=3

One-way ANOVAにて分析し有意差を認めた際、post-hoc法で判定した。

1週:One-way ANOVA (p=0.0003) 各群間をpost-hoc法で判定

4週:One-way ANOVA (p=0.0001) 各群間をpost-hoc法で判定

titanium alloy: チタン bare Mg alloy: 裸材

Mg alloy/CR: 耐蝕層 Mg alloy/CR+brushite: ブルシャイト

†:チタンと同時期において有意差を認める。

*:マグネシウム合金間での有意差を表している。

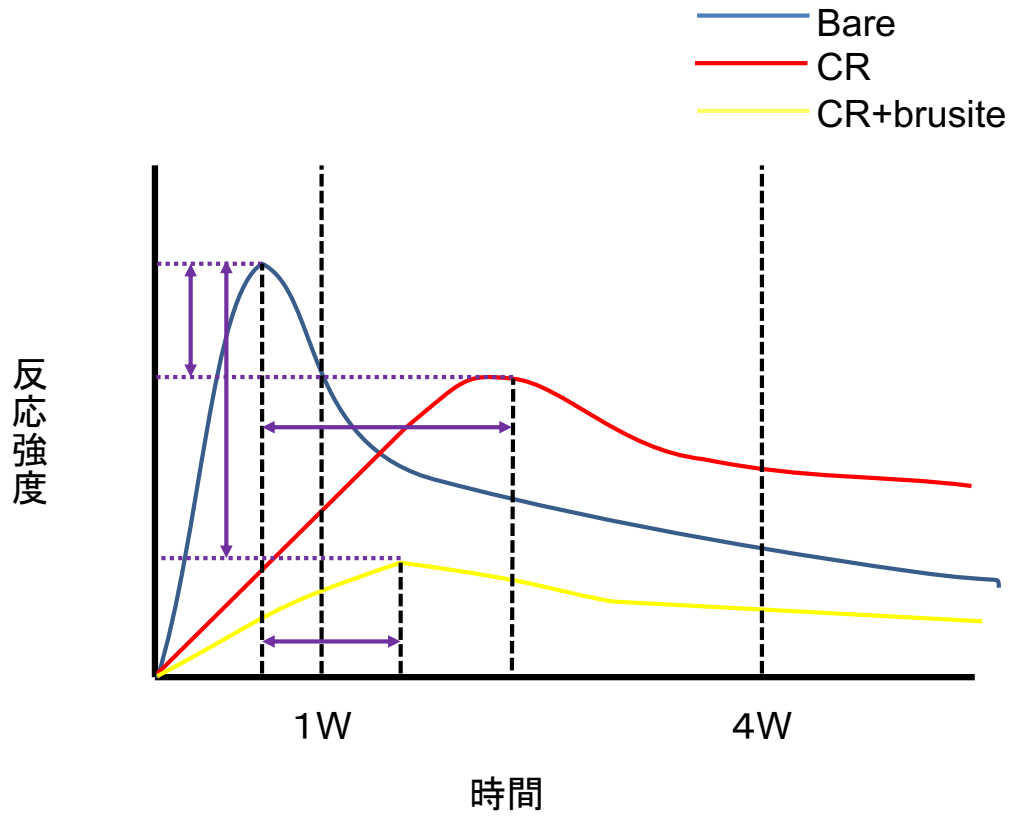


図21. マグネシウム合金の生体内反応の想定図

Bare : 裸材 (青)

CR: 耐蝕層 (赤)

CR+brushite: ブルシャイト(黄)

↑ : 反応強度ピークの変化

↔ : ピークまでの時間変化

コーティング表面処理により反応強度（縦軸）が変わり、そのピークまでの時間（横軸）が遷延すると思われる。

表 1

3 次元解析によるガス体積

Nail Material	1 W		4 W	
	Mean Volume	SD	Mean Volume	SD
	(mm ³)		(mm ³)	
Titanium Alloy	0	±0	0	±0
Mg Alloy/Bare	9.35 †	±2.65	5.4	±1.47
Mg Alloy/CR	15.45 †	±5.30	11.34 † *	±5.76
Mg Alloy/CR+Brusite	8.30 †	±1.90	2.72	±1.51

Titanium alloy: チタン Mg alloy /Bare: 裸材

Mg alloy/CR: 耐蝕層 Mg alloy/CR+brushite: ブルシャイト

値は平均±SD として表す。† *: p 値 < 0.05, n=3

One-way ANOVA にて分析し有意差を認めた際、post-hoc 法で判定した。

1 週:One-way ANOVA(p=0.0022) 各群間を post-hoc 法で判定

4 週:One-way ANOVA(p=0.0104) 各群間を post-hoc 法で判定

†:チタンと同時期において有意差を認める

*: 4 週においてブルシャイトと有意差を認める

表 2

3次元解析による新生骨量

Nail Material	<i>1 W</i>		<i>4 W</i>	
	<i>Mean Volume</i>	<i>SD</i>	<i>Mean Volume</i>	<i>SD</i>
	(<i>mm³</i>)		(<i>mm³</i>)	
Titanium Alloy	1.14	±0.67	1.75	±0.58
Mg Alloy/Bare	1.78	±1.32	5.40 †	±1.28
Mg Alloy/CR	1.80	±0.51	7.73 † *	±2.06
Mg Alloy/CR+Brusite	2.51	±1.46	3.36	±0.80

Titanium alloy: チタン Mg alloy /Bare: 裸材

Mg alloy/CR: 耐蝕層 Mg alloy/CR+brushite: ブルシャイト

値は平均±SD として表しています。† *: p 値 < 0.05, n=3

One-way ANOVA にて分析し有意差を認めた際、post-hoc 法で判定した。

1 週:One-way ANOVA(p=0.4839) 各群間で有意差認めず

4 週:One-way ANOVA(p=0.0027) 各群間を post-hoc 法で判定

†: 4 週においてチタンと有意差を認める

*: 4 週においてブルシャイトと有意差を認める

表 3

3次元解析によるネイル体積

Nail Material	<i>1 W</i>		<i>4 W</i>	
	<i>Mean Volume</i>	<i>SD</i>	<i>Mean Volume</i>	<i>SD</i>
	<i>(mm³)</i>		<i>(mm³)</i>	
Titanium Alloy	5.69	±0.11	5.51	±0.13
Mg Alloy/Bare	4.46 †	±0.22	4.42 †	±0.06
Mg Alloy/CR	4.25 †	±0.38	3.76 † *	±0.38
Mg Alloy/CR+Brusite	4.42 †	±0.17	4.30 †	±0.27

Titanium alloy: チタン Mg alloy /Bare: 裸材

Mg alloy/CR: 耐蝕層 Mg alloy/CR+brushite: ブルシャイト

値は平均±SD として表しています。† *: p 値 < 0.05, n=3

One-way ANOVA にて分析し有意差を認めた際、post-hoc 法で判定した。

1 週:One-way ANOVA(p=0.0003) 各群間を post-hoc 法で判定

4 週:One-way ANOVA(p=0.0001) 各群間を post-hoc 法で判定

†: チタンと同時期において有意差を認める

*: 4 週において裸材と有意差を認める